

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
窪 木 拓 男 印	研究総括ならびに指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 インプラント再生補綴学分野	身分 大学院生	氏名 國友 雅義
論文題名 マウス骨髄由来間葉系幹細胞の免疫調節能と年齢		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p><b>【背景】</b></p> <p>骨髄由来間葉系幹細胞は、自己複製能や多分化能に加え、免疫調節能を持つ細胞群である。これらの機能を応用した組織再生療法や全身性幹細胞移植療法の実用化が広く試みられているものの、移植コストや幹細胞の質の維持等、解決すべき問題が存在するのが現状である。一方、間葉系幹細胞機能に影響を及ぼす因子の一つとして、宿主の年齢との関連性が示唆されているものの、その詳細はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、週齢の異なるマウスの骨髄の形態計測学的検討に加え、骨髄由来間葉系幹細胞を抽出し、週齢の違いが、間葉系幹細胞の免疫調節能や幹細胞性にどのような影響を及ぼすか検討した。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <p>1. 実験動物：5週齢ならびに40週齢C57BL6/Jマウス（雌）大腿骨より骨髄由来間葉系幹細胞（BMSCs）を単離・培養し、実験に使用した。また、出血性大腸炎モデルは、8週齢マウスに2%デキストラン硫酸ナトリウム水溶液を経口摂取させることで誘導した。本研究は、岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2015187）のもと実施した。</p> <p>2. 大腿骨のマイクロCTならびに組織学的解析：それぞれの週齢のマウス大腿骨を採取し、マイクロCTにて骨量を、組織切片作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織学的解析を行った。</p> <p>3. BMSCsの単離・培養：それぞれの週齢のマウス大腿骨より、BMSCsを既報の方法（Friedenstein et al, 1974）によって単離、培養し、コロニー形成能を有する付着細胞群を獲得した。実験に必要な細胞数が得られるまで継代し、P2を以降の実験に使用した。</p> <p>4. 細胞表面抗原解析による幹細胞性の評価：それぞれの週齢のBMSCsの表面抗原を解析することで幹細胞性を評価した。すなわち、BMSCs陽性抗原として、CD146, Sca-1, CD44を、陰性抗原として、CD34, CD14の発現をフローサイトメトリーにて解析した。</p> <p>5. 多分化能の評価：それぞれの週齢のBMSCsの多分化能を、骨芽細胞分化誘導および脂肪細胞分化誘導にて検討した。骨芽細胞分化誘導培地にて28日間培養し、アリザリンレッド染色にてカルシウム塩の沈着、ならびにリアルタイムPCR法にて <i>alp</i>, <i>ocn</i> の遺伝子発現を評価した。同様に脂肪細胞分化誘導培地にて5日間培養し、オイルレッド染色にて脂肪滴形成、ならびに <i>lpl</i>, <i>ppary</i> の遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて評価した。</p>		

7. 免疫調節能の評価 (*in vitro*) : BMSCsの免疫調節能を評価する為に、それぞれの週齢のBMSCsが産生する、抗炎症性サイトカイン (*il2*, *il10*, *tgfb1*, *hgf*) の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRを用いて比較した。また、免疫調節能の指標としてが重要であることが報告されているFasL, MCP-1の発現をフローサイトメトリー解析にて検討した。さらには、FasL, MCP-1が発現した結果生じる免疫調節能を*in vitro*で評価するために、BMSCsをT細胞と共培養し、T細胞のアポトーシス誘導をフローサイトメトリーで、T細胞遊走誘導をボイデンチャンバー法にて評価した。

8. 免疫調節能の評価 (*in vivo*) : それぞれの週齢のBMSCsの*in vivo*での免疫調節能を評価する為に、デキストラン硫酸ナトリウム誘導出血性大腸炎モデル(n=3)にBMSCsを全身投与し、体重変化、下痢の有無、炎症性細胞の腸管への浸潤を評価した。PBS投与群を疾患コントロール群 (n=3) とし、大腸炎非誘導群をコントロール群 (n=3) とした。

9. BMSCsの細胞老化の評価 : 週齢の変化に伴うBMSCsの細胞老化の有無について、老化関連 $\beta$ gal 染色、ならびに老化関連因子として知られるP16, P21の発現をウエスタンブロッティング法にて評価した。統計解析には、one-way ANOVA, ならびにunpaired-*t*検定を用いた。

## 【結果】

1. マイクロCTならびに組織学的評価より、40週齢大腿骨は、5週齢と比較して、骨梁ならびに骨塩量の著明な低下や脂肪組織の増加を認めた。

2. 40週齢BMSCsは、5週齢BMSCsと比較して、幹細胞陽性マーカーの発現が低いことが明らかになった。

3. 40週齢BMSCsは、5週齢BMSCsと比較して、*ocn*の発現とカルシウム塩沈着が低く、骨芽細胞分化能が低下していることが明らかになった。反対に、*ppary*の発現、脂肪滴の形成が高く、脂肪細胞分化能が上昇していることが明らかになった。

4. 40週齢BMSCsは、5週齢BMSCsと比較して、*tgfb1*の遺伝子発現が低く、また、FasL, MCP-1の発現も低いことが明らかになった。さらには、*in vitro*において、T細胞のアポトーシス誘導や、T細胞遊走誘導能が低下していることが明らかになった。

5. デキストラン硫酸ナトリウム誘導出血性大腸炎モデルに対する全身性移植療法では、40週齢BMSCsは、5週齢BMSCsと比較して、体重減少抑制効果、大腸短縮化抑制効果、炎症性細胞の腸管への浸潤抑制効果について効果が認められなかった。

6. 40週齢BMSCsは、5週齢BMSCsと比較して、老化関連 $\beta$ gal陽性細胞の割合が高く、P16, P21の発現も高いことが明らかになった。

## 【考察とまとめ】

本研究では、宿主の年齢の違いが、間葉系幹細胞の幹細胞性や免疫調節能にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とし、週齢の異なるマウスBMSCsを比較した。その結果、週齢の高いマウス由来BMSCsでは、①骨芽細胞分化が低下していること、②脂肪細胞分化が上昇していること、③免疫調節能が低下していることが明らかとなった。このことから、骨組織再生を目的とした組織再生療法や、全身性免疫疾患に対する移植療法においては、宿主年齢の高いBMSCsは、期待される治療効果が得られない可能性が示唆された。宿主の年齢がどのようなメカニズムで幹細胞機能に影響を与えるのか、今後の更なる検討が必要である。